

THIẾT KẾ VECTOR BIỂU HIỆN VÀ TẠO CHỦNG VI KHUẨN *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* MANG GEN *ZmbZIP72* PHÂN LẬP TỪ CÂY NGÔ

Phạm Thị Hằng, Hà Hồng Hạnh, Nguyễn Thùy Linh, Lê Thị Thu Hiền, Nông Văn Hải, Huỳnh Thị Thu Huệ[✉]

Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

[✉] Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: hthue@igr.ac.vn

Ngày nhận bài: 25.4.2016

Ngày nhận đăng: 25.4.2017

TÓM TẮT

Ở thực vật, các yếu tố phiên mã họ bZIP (basic leucine zipper) thường liên quan đến nhiều quá trình sinh học khác nhau như sự biệt hóa mô, cơ quan hay sự phát sinh bó mạch. Hơn nữa, họ gen bZIP còn là một trong những họ lớn thuộc nhóm gen mã hóa nhân tố phiên mã, có vai trò quan trọng đối với quá trình đáp ứng các điều kiện bất lợi của môi trường. Tuy nhiên chỉ một số ít gen mã hóa cho yếu tố phiên mã bZIP liên quan đến đáp ứng stress phi sinh học. Các nghiên cứu đã phát hiện rằng thực vật được chuyển gen bZIP có biểu hiện tăng cường tính chống chịu các stress phi sinh học. Một vài gen liên quan đáp ứng stress ở cây ngô cũng đã được phân lập và xác định đặc điểm. Trong đó, gen *ZmbZIP72* thuộc nhóm A được cảm ứng mạnh mẽ bởi ABA và stress phi sinh học. Nghiên cứu đã có trước đây cho thấy, sự tăng cường biểu hiện gen *ZmbZIP72* đã làm tăng khả năng chống chịu hạn ở cây *Arabidopsis* chuyển gen. Trong nghiên cứu này, gen *ZmbZIP72* được phân lập từ cDNA của giống ngô Q12 xử lý hạn 6 giờ với kích thước vùng mang mã là 894 bp. Kết quả phân tích trình tự cho thấy, đoạn gen *ZmbZIP72* có hai điểm sai khác so với trình tự tham chiếu trên GenBank (mã số HQ328839) tại vị trí 486 A>C và vị trí 493 C>T. Các thay đổi này dẫn đến sự thay đổi amino acid Lysine>Asparagine và Proline>Serine. Gen *ZmbZIP72* được ghép nối với RD29A promoter (promoter cảm ứng stress) và 35S terminator trong vector trung gian pRTL2 để tạo nên cấu trúc biểu hiện RD29::*ZmbZIP72*::35S. Vector biểu hiện thực vật pCAMBIA 1301 mang cấu trúc gen *ZmbZIP72* đã được thiết kế và biến nạp vào tế bào vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* chủng EHA105 phục vụ công tác chuyển gen thực vật.

Từ khóa: *A. tumefaciens*, gen *ZmbZip72*, nhân tố phiên mã, ngô, thiết kế vector

MỞ ĐẦU

Thực vật thường xuyên phải chống chịu lại các stress của môi trường như hạn, mặn và lạnh đây là những tác nhân phi sinh học ảnh hưởng lớn tới năng suất cây trồng. Những nghiên cứu phân tử cho thấy, abscisic acid (ABA) đóng vai trò quan trọng trong việc giúp thực vật đáp ứng và thích ứng với các stress phi sinh học (Finkelstein *et al.*, 2002, Xiong *et al.*, 2002). Phần lớn các gen đáp ứng với stress được điều hòa bởi ABA, nhưng một số gen thì không phụ thuộc ABA, cho thấy sự tồn tại của các cơ chế điều hòa phân tử khác biệt trong sự biểu hiện của gen đáp ứng stress, với một con đường điều hòa phụ thuộc ABA và một con đường điều hòa không phụ thuộc ABA (Yamaguchi-shinozaki, Shinozaki 2006;

Wasilewska *et al.*, 2008; Nakashima *et al.*, 2009).

Khi thực vật bị stress, hàm lượng ABA tăng lên, kích hoạt các gen đáp ứng ABA, từ đó kích hoạt các phản ứng sinh lý kháng hạn. Phân tích promoter của các gen đáp ứng ABA cho thấy các yếu tố đáp ứng ABA (ABREs) là yếu tố hoạt động *cis* chủ yếu trong việc kích hoạt các gen đáp ứng lại ABA (Guiltinan *et al.*, 1990; Mundy *et al.*, 1990; Busk và Pages 1998). Một nhóm các nhân tố kích hoạt bám vào ABREs là các protein basic leucine zipper (bZIPs), nhóm protein này bao gồm vùng bám với DNA và vùng leucinezipper có vai trò trong quá trình dimer hóa (Kim *et al.*, 2006; Choi *et al.*, 2000; Uno *et al.*, 2000).

Nhóm bZIPs là một trong những nhóm yếu tố phiên mã lớn nhất ở thực vật, chúng tham gia điều

hòa nhiều chức năng tế bào, đặc biệt là quá trình điều hòa trong đáp ứng stress của môi trường và cảm ứng tín hiệu hormone (Kim, 2006). Ngoài ra, chúng còn tham gia vào nhiều quá trình sinh học khác như sự biệt hóa mô, cơ quan và sự phát sinh bó mạch (Wang *et al.*, 2015). Họ gen bZIP đã được phân lập và mô tả ở *Arabidopsis* (với 75 gen), đậu tương (131 gen), ngô (125 gen) (Wei *et al.*, 2012). Ở lúa, 89 gen bZIP cũng được chia thành 11 nhóm, trong đó 33 gen tham gia phản ứng với hạn (Nijhawan *et al.*, 2008). Trong số đó, 5 gen *ABF3*, *OsZIP23*, *OsZIP46*, *OsZIP52* và *OsZIP72* được cho là tạo nên khả năng thích ứng với hạn khi biểu hiện quá mức ở lúa. Phần lớn các bZIP liên kết với ABRE thuộc nhóm A, các gen trong nhóm này được cảm ứng mạnh mẽ bởi ABA và stress phi sinh học khác (Jakoby *et al.*, 2002, Lu *et al.*, 2009). Ở *Arabidopsis*, 75 gen khác nhau đã được xác định và phân bố thành 10 nhóm dựa vào vùng bảo thủ trên gen nhưng còn khoảng 50 gen chưa được mô tả trong các cơ sở dữ liệu. Trong số 7 gen thuộc nhóm A, nhóm tham gia quá trình chống chịu stress và đáp ứng ABA thì chỉ có 3 gen tham gia vào sự chịu hạn của cây. Đó là ABRE-binding protein 1 và 2 (AREB1 và AREB2) và ABRE binding factor 3 (ABF3) (Jakoby *et al.*, 2002). Vai trò của các bZIP của lúa còn được nghiên cứu kỹ trong việc đáp ứng stress sinh học hay phi sinh học, trong đáp ứng tại lưới nội chất hay trong quá trình phát triển của hạt lúa (Z G E *et al.*, 2014)

Cây ngô là một trong các loại cây ngũ cốc quan trọng đối với con người. Sự sinh trưởng và phát triển của cây ngô chịu ảnh hưởng lớn bởi rất nhiều các stress phi sinh học, trong đó khô hạn là yếu tố ảnh hưởng nhiều nhất đến năng suất. Một số gen liên quan đến stress ở ngô đã được phân lập và mô tả khá rõ trong các nghiên cứu như Wei *et al.*, (2012) đã xác định được 170 protein là yếu tố phiên mã bZIP ở ngô được mã hóa bởi 125 gen *bZIP* được đặt tên từ *ZmZIP1* đến 125 dựa theo quy ước đặt tên của Jakoby *et al.*, (2002) và được phân thành 11 nhóm như ở *Arabidopsis*. Tuy nhiên, chỉ một số ít các gen mã hóa cho yếu tố phiên mã bZIP liên quan đến đáp ứng stress phi sinh học đã được công bố (Nieva *et al.*, 2005; Jia *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2008, 2011). Đến nay, họ gen *bZIP* đã được nghiên cứu xác định tính đa dạng và phân tích sự biểu hiện trong toàn hệ gen trên nhiều loài khác như thầu dầu (Jin *et al.*, 2014), các cây họ đậu (Wang *et al.*, 2015) hay sắn (Hu *et al.*, 2016).

Gen *ZmZIP72* của cây ngô đã được phân lập và mô tả bởi Sheng *et al.*, (2012). Gen mã hóa

ZmZIP72 chỉ có một bản sao trong genome của ngô với chiều dài 2164 bp, gồm 3 intron, giống với sự phân bố của các intron ở hầu hết các gen *bZIP* thuộc nhóm A ở *Arabidopsis* và lúa. Gen *ZmZIP72* chứa một khung đọc mở dài 894 bp mã hóa cho chuỗi polypeptide dài 297 amino acid. Protein suy diễn của *ZmZIP72* có trình tự amino acid tương đồng cao với protein *OsZIP72* của lúa (Sheng *et al.*, 2012). Khi chuyển cDNA *ZmZIP72* vào *Arabidopsis* dưới sự điều khiển của promoter CaMV35S, dòng chuyển gen thể hiện một số đặc điểm thích ứng với hạn. Những kết quả kiểu hình và thay đổi sinh lý này cho thấy sự biểu hiện quá mức *ZmZIP72* ở cây *Arabidopsis* chuyển gen có thể làm tăng đáng kể khả năng thích ứng với khô hạn (Sheng *et al.*, 2012). Qua đó cho thấy, gen *ZmZIP72* có tầm quan trọng đáng kể tới sự chống chịu hạn của thực vật.

Với mục đích phân lập được các gen liên quan đến cơ chế chống chịu hạn của thực vật trên các giống ngô địa phương có tính chịu hạn tốt của Việt Nam để làm nguyên liệu cho chuyển gen, trong nghiên cứu này, đoạn gen *ZmZIP72* đã được phân lập từ giống ngô Q12 của Việt Nam (Tè vàng chất đạo), đồng thời thiết kế các vector biểu hiện thực vật mang gen *ZmZIP72* dưới sự điều khiển của promoter cảm ứng stress RD29A và biến nạp vào chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* làm nguyên liệu phục vụ các nghiên cứu chuyển gen thực vật.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Giống ngô Q12 do Viện Nghiên cứu Ngô cung cấp. Hạt ngô được gieo mầm và phát triển đến giai đoạn 3 lá thì xử lý hạn nhân tạo theo phương pháp của Sheng *et al.*, (2012). Mẫu lá tại các thời điểm: 1 h, 3 h và 6 h được thu giữ và bảo quản trong Nito lỏng, ở -70°C.

Bảng 1. Trình tự primer được sử dụng trong nghiên cứu.

Tên mồi	Trình tự mồi
ZmZIP72 F	5' AAGGGTTTCGGCTCCGTGAAC 3'
ZmZIP72 R	5' TAGCAAGTGCAAGTCATGTGC 3'
ZmZIP72 SacI F	5' ATGAGAGCTCATGGACGAGCTG 3'
ZmZIP72 SacI R	5' TAATGAGCTCTCACCAGGGGGC 3'

Các vector và vi khuẩn được sử dụng gồm: vector tách dòng pJET 1.2, vector tách dòng trung gian pRTL2 mang promoter RD29A, vector biểu

hiện thực vật pCAMBIA1301, chủng vi khuẩn *E. coli* DH10 β , chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* EHA105.

Các cặp primer nhân gen được thiết kế dựa trên trình tự công bố trên GenBank mã số HQ328839 của giống ngô CN165.

Phương pháp

Tách chiết RNA tổng số từ cây ngô xử lý hạn

RNA tổng số được tách chiết từ 2 g mẫu lá ngô đã được xử lý hạn, sử dụng TriReagent theo phương pháp của Sambrook và Rusell (2001).

Tổng hợp cDNA

Mẫu RNA tổng số (1 μ g) được sử dụng cho phản ứng tổng hợp sợi cDNA thứ nhất theo quy trình của First-Strand cDNA Synthesis Kit for Real – Time PCR (hãng Affymetrix), sử dụng mỗi đặc hiệu gen.

Phân lập gen *ZmbZIP72*

Gen *ZmbZIP72* được nhân từ cDNA của cây ngô đã xử lý hạn bằng kỹ thuật PCR với primer *ZmbZIP72F/ R* có nhiệt độ gắn mỗi 60°C, sử dụng enzyme DreamTaq polymerase. Sản phẩm PCR được tinh sạch theo quy trình của GeneJET Gel Extraction Kit (hãng Thermo Scientific) và được tạo dòng trong vector pJET1.2 theo quy trình của Clone JET Kit (hãng Thermo Scientific).

Xác định và phân tích trình tự gen *ZmbZIP72*

Trình tự nucleotide của gen được xác định trên hệ thống máy giải trình tự ABI 3500. Kết quả giải trình tự được xử lý bằng phần mềm BioEdit. Trình tự gen sau khi xử lý được so sánh với cơ sở dữ liệu trên GenBank.

Thiết kế vector mang cấu trúc biểu hiện *RD29A::ZmbZIP72::35S*

Vector tách dòng pJET1.2 mang gen *ZmbZIP72* được dùng làm khuôn trong PCR với primer *ZmbZIP72 SacI F/SacI R* nhân đoạn *ZmbZIP72* treo điểm nhận biết của *SacI* nhằm gắn với vector trung gian pRTL2 đã được xử lý *SacI*. Vector pRTL2 có chứa cấu trúc *RD29A::35S* gồm promoter *RD29A* và terminator *35S*, gen *ZmbZIP72* được chèn vào giữa để tạo cấu trúc biểu hiện *RD29A::ZmbZIP72::35S*. Đoạn cấu trúc biểu hiện gen được cắt với *HindIII* và

ghép nối với vector biểu hiện thực vật pCAMBIA 1301 đã mở vòng với *HindIII*.

Tạo chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* mang vector tái tổ hợp

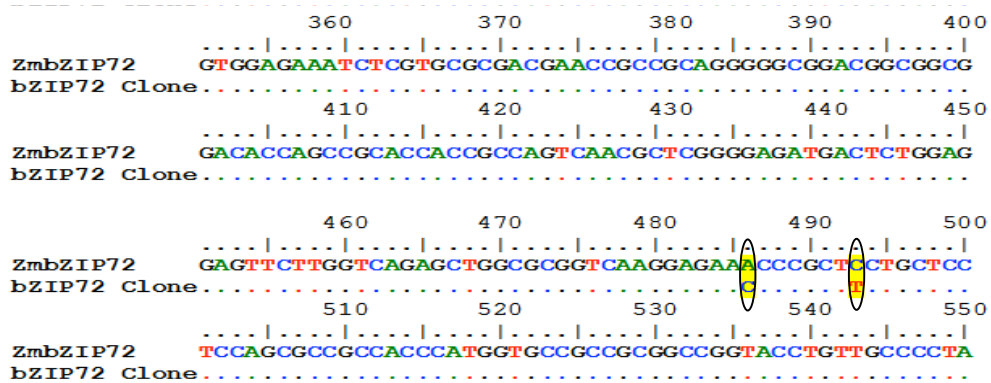
Vector biểu hiện thực vật mang cấu trúc biểu hiện gen *ZmbZIP72* được biến nạp vào tế bào vi khuẩn *A. tumefaciens* chủng EHA 105 theo phương pháp xung điện.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân lập gen *ZmbZIP72* từ cDNA của lá ngô Q12

Dựa trên trình tự gen *ZmbZIP72* đã công bố trên GenBank (HQ328839), cặp mỗi đặc hiệu *ZmbZIP72 F/R* cho PCR nhân đoạn gen *ZmbZIP72* đã được thiết kế (Bảng 1). Theo Sheng *et al.*, (2012), gen *ZmbZIP72* biểu hiện mạnh nhất ở lá của cây ngô trong giai đoạn ba lá khi xử lý hạn 6 h. Vì vậy, RNA tổng số được tách từ mẫu mô lá cây ngô giai đoạn ba lá xử lý hạn nhân tạo trong 6 h. Với 0,5 μ g mẫu RNA tổng số, sợi cDNA thứ nhất được tổng hợp theo quy trình của First-Strand cDNA Synthesis Kit for Real - Time PCR. PCR được thực hiện với khuôn mẫu là cDNA, sử dụng enzyme DreamTaq polymerase với cặp mỗi *ZmbZIP72 F/R*, nhiệt độ gắn mỗi 60°C. Kết quả, đoạn DNA kích thước khoảng 1 kb có kích thước đúng với tính toán lý thuyết (953 bp) đã được nhân bản thành công.

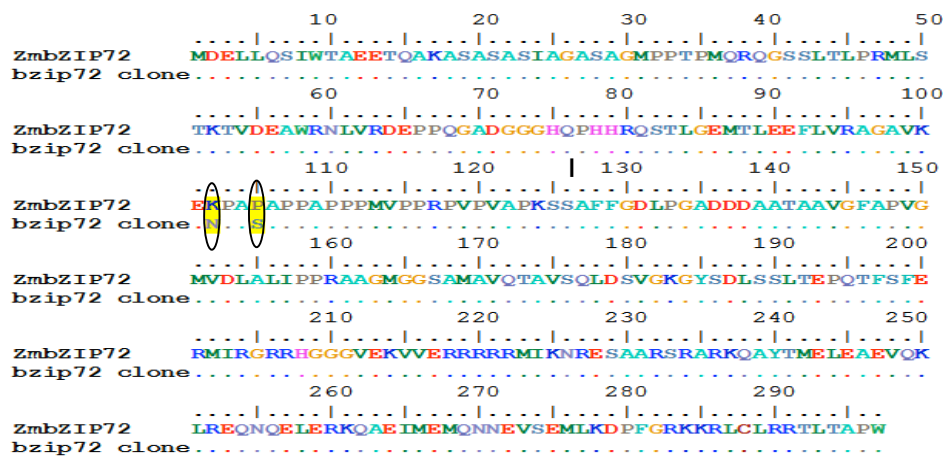
Nhằm mục đích tạo dòng và xác định trình tự nucleotide đoạn gen, sản phẩm PCR đã tinh sạch được gắn vào vector pJET 1.2 sử dụng CloneJET PCR Cloning Kit và biến nạp sản phẩm lai vào tế bào khả biến *E. coli* DH10 β . Ba dòng plasmid được lựa chọn để kiểm tra bằng enzyme giới hạn *BglII*, enzyme có hai điểm cắt nằm ở 2 đầu của đoạn chèn. Kết quả, dòng số 20 mang đoạn chèn có kích thước khoảng 1 kb phù hợp với kích thước đoạn gen *ZmbZIP72*, được xác định trình tự nucleotide theo cả hai chiều với cặp mỗi M13 F/R sử dụng phương pháp Sanger trên máy giải trình tự ABI 3500. Kết hợp giữa kết quả giải trình tự mỗi M13 F và mỗi M13 R, trình tự hoàn chỉnh của gen *ZmbZIP72* có kích thước 953 bp đã được xác định. Kết quả so sánh trình tự này với trình tự tham chiếu trên GenBank (mã số: HQ328839), cho thấy hai đoạn gen có độ tương đồng 99%, với 2 điểm thay đổi: vị trí 486 A>C, vị trí 493 C>T (Hình 1).



Hình 1. So sánh trình tự nucleotide giữa đoạn gen *ZmbZIP72* từ giống Q12 với trình tự tham chiếu *ZmbZIP72*: trình tự tham chiếu trên GenBank mã số: HQ328839; bZIP72 clone: trình tự đoạn gen *ZmbZIP72* phân lập từ giống Q12.

Sử dụng công cụ online <http://insilico.ehu.es/translate/> để dịch mã đoạn gen thu được từ giống Q12, trình tự amino acid suy diễn của đoạn nucleotide dài 894 bp với 297 amino acid, tương ứng với trình tự amino acid của protein *ZmbZIP72* trong CSDL của NCBI mã số ADO19904. Kết quả so sánh (Hình 2) cho thấy, hai vị trí nucleotide bị thay đổi trong vùng mang mã dẫn đến sự thay đổi trình tự amino acid, với thay đổi A>C dẫn tới mã bộ ba AAA>AAC và làm cho Lysine>Asparagine. Với thay đổi C>T làm cho mã

CCT > TCT dẫn tới Proline> Serine. Tuy nhiên, các thay đổi amino acid này đều không thuộc vùng chức năng quan trọng của protein *ZmbZIP72* như vùng lõi, vùng gắn protein, những thay đổi này có thể là sự đa hình của gen *ZmbZIP72* ở giống Q12 so với giống CN165. Các kết quả thu được có thể khẳng định gen *ZmbZIP72* từ giống ngô Q12 đã được phân lập và tách dòng thành công với độ dài 953 bp bao gồm toàn bộ vùng mang mã dài 894 bp và 21 bp thuộc vùng 5' trước mã mở đầu và 38 bp vùng 3' sau mã kết thúc.



Hình 2. So sánh trình tự amino acid suy diễn của vùng mang mã trên đoạn gen *ZmbZIP72* giống Q12 với trình tự tham chiếu. Chú thích: *ZmbZIP72*: Trình tự acid amin của protein *ZmbZIP72* trong CSDL của NCBI: ADO19904; *ZmbZIP72* clone: Trình tự amino acid suy diễn từ đoạn gen *ZmbZIP72* phân lập ở giống Q12.

Thiết kế gen *ZmbZIP72* trong vector trung gian pRTL2

Sau khi đoạn gen *ZmbZIP72* được phân lập và tách dòng trong vector pJET1.2, chúng tôi sử dụng

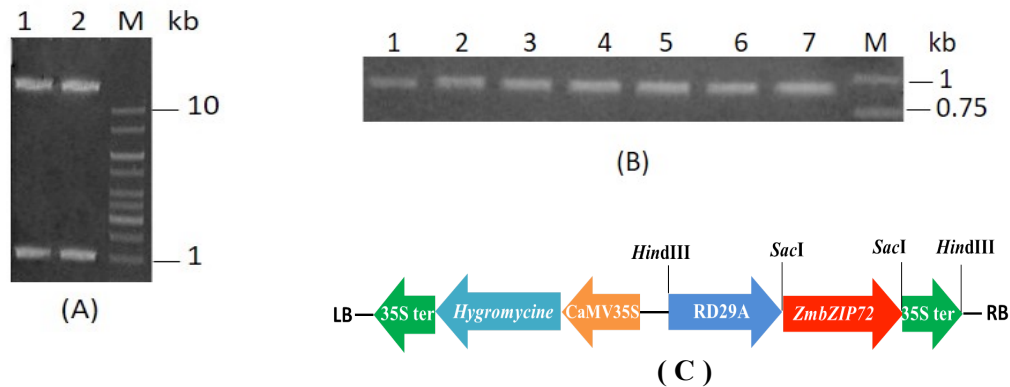
plasmid tái tổ hợp mang gen *ZmbZIP72* làm khuôn cho phản ứng PCR với cặp mồi *ZmbZIP72*SacIF/SacIR, đoạn gen được nhân lên với cặp mồi này sẽ có kích thước 894bp bao gồm toàn bộ vùng mang mã của gen.

Để biểu hiện gen trong tế bào thực vật, gen *ZmbZIP72* cần được đưa vào cấu trúc biểu hiện thích hợp vì vậy chúng tôi ghép nối đoạn gen *ZmbZIP72* với vector tách dòng trung gian pRTL2 có kích thước 2.6 kb chứa đoạn trình tự cần thiết cho biểu hiện gen gồm promoter cảm ứng stress RD29A kích thước 841 bp và 35S terminator dài 246 bp, gen đích được chèn vào giữa tại điểm nhận biết của *SacI*.

Đoạn gen *ZmbZIP72* được tạo đầu dính tương ứng bằng *SacI*, vector pRTL2 cũng được xử lý bằng *SacI* để mở vòng và ghép nối với nhau sau đó biến nạp vào tế bào vi khuẩn *E. coli* DH10 β theo phương pháp sốc nhiệt. Kết quả tách plasmid từ các khuẩn lạc sau biến nạp, chúng tôi chọn được một dòng plasmid số 32 có mang vector tái tổ hợp pRTL2_ *bZIP72*.

Đoạn gen *ZmbZIP72* được xác định chiều trong plasmid tái tổ hợp số 32 trước khi được sử dụng cho các thí nghiệm sau đó. Trình tự của vector pRTL2 -

ZmbZIP72 đều có vị trí nhận biết của enzyme giới hạn *BamHI* (vị trí 834 trong vùng CDS của gen và vị trí 865 ở vùng linker của vector), vì vậy khi sử dụng đồng thời cả 2 enzyme *HindIII* và *BamHI* sẽ xác định được chiều của gen *ZmbZIP72*. Nếu đúng chiều, khi điện di sản phẩm cắt thì trên bản gel sẽ xuất hiện bốn băng có kích thước: 2,6kb, 1,7kb, 235 bp, 70 bp. Khi điện di kiểm tra sản phẩm cắt, chúng tôi thấy xuất hiện các sản phẩm cắt đúng với tính toán lý thuyết. Như vậy, đoạn gen *ZmbZIP72* được chèn vào trong vector pRTL2 đúng chiều (kết quả được mô tả ở hình 3C). Trình tự của cấu trúc biểu hiện chứa gen *ZmbZIP72* đã được xác định lại với các cặp mồi trên vùng promoter RD29A và mồi trên vùng polyA cho kết quả khớp với kết quả cắt với enzyme giới hạn và không có sự biến đổi nucleotide. Vì vậy, chúng tôi tiến hành tách chiết lượng lớn dòng plasmid trên để phục vụ cho các thí nghiệm tiếp theo.



Hình 3. Kết quả gắn cấu trúc RD29A::*ZmbZIP72*::35S vào vector pCambia1301. (A): Sản phẩm cắt vector pCambia1301 tái tổ hợp với enzyme *HindIII*; M: marker 1kb; 1- 2: sản phẩm cắt của 2 dòng plasmid tái tổ hợp được chọn; (B): PCR nhận gen *ZmbZIP72* từ plasmid tách từ *A. tumefaciens* chủng EHA105; 1:PCR từ plasmid đối chứng dương; 2-7: sản phẩm PCR từ 6 dòng plasmid tái tổ hợp; M: marker 1kb; (C): Sơ đồ cấu trúc gen *ZmbZIP72*.

Thiết kế vector biểu hiện thực vật pCambia1301 mang gen *ZmbZIP72*

Để tạo vector biểu hiện thực vật mang gen *ZmbZIP72*, vector pRTL2 đã mang gen *ZmbZIP72* được xử lý bằng enzyme *HindIII* để tạo đoạn cấu trúc RD29A::*ZmbZIP72*::35S mang đầu dính *HindIII*. Sản phẩm ghép nối giữa vector pCambia1301 được mở vòng với enzyme tương ứng với đoạn cấu trúc RD29A::*ZmbZIP72*::35S trên được biến nạp vào tế bào vi khuẩn *E. coli* chủng DH10 β khả biến theo phương pháp sốc nhiệt. Qua kết quả tách plasmid, 2 dòng plasmid được lựa chọn và xử lý với enzyme *HindIII* để kiểm tra sự có mặt

của cấu trúc biểu hiện gen RD29A::*ZmbZIP72*::35S trong pCambia1301. Phân tích kết quả điện di sản phẩm cắt enzyme trên gel agarose 0.8% (hình 3A) cho thấy, cả hai dòng plasmid trên khi xử lý với enzyme giới hạn *HindIII* đều cho ra 2 đoạn DNA, một đoạn có kích thước khoảng 1,99 kb và một có kích thước khoảng 11 kb. Hai đoạn DNA này tương ứng với vector pCambia1301 (11 kb) và cấu trúc biểu hiện gen *ZmbZIP72* (~1,99 kb). Như vậy, cấu trúc mang gen *ZmbZIP72* đã được chuyển thành công vào vector biểu hiện thực vật pCambia1301. Gen *ZmbZIP72* được điều khiển bởi promoter RD29A với sơ đồ cấu trúc như mô tả trên Hình 3C.

Tạo chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* mang vector tái tổ hợp pCAMBIA1301 - ZmbZIP72

Nhằm phục vụ nghiên cứu ở cây mô hình hay chuyển gen vào cây đích thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens*, vector biểu hiện pCAMBIA1301 mang gen ZmbZIP72 được biến nạp vào tế bào vi khuẩn *A. tumefaciens* chủng EHA105 bằng xung điện. Các dòng *A. tumefaciens* tái tổ hợp sau biến nạp được kiểm tra bằng PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu gen ZmbZIP72SacI F/R. Kết quả điện di trên gel agarose 0.8% (Hình 3B) cho thấy 6 dòng được lựa chọn đều xuất hiện băng DNA có kích thước khoảng 1 kb, tương ứng với kích thước đoạn gen ZmbZIP72 là 894 bp. Kết quả này chứng tỏ các dòng vi khuẩn *A. tumefaciens* đã mang vector biểu hiện có chứa gen ZmbZIP72. Như vậy, một vector biểu hiện thực vật thuộc hệ pCAMBIA và một dòng vi khuẩn *A. tumefaciens* tái tổ hợp đã được thiết kế thành công. Theo nghiên cứu của nhóm Sheng *et al.*, 2012 đã sử dụng gen ZmbZIP72 để chuyển vào cây *Arabidopsis* cho thấy hiệu quả làm tăng tính chống chịu ở cây chuyển gen, nhóm tác giả đã sử dụng promoter cơ định 35S, tuy nhiên theo nghiên cứu của nhóm Sakuma *et al.*, 2006 việc biểu hiện quá mức của gen *DREB2A* do promoter cơ định 35S điều khiển có thể làm cây chuyển gen còi cọc hơn. Do vậy trong nghiên cứu này, chúng tôi đã sử dụng promoter RD29A trong cấu trúc biểu hiện đây là một promoter cảm ứng stress mạnh, với việc sử dụng promoter này có thể giúp cho việc biểu hiện gen chuyển chỉ xảy ra khi có stress sẽ hạn chế được sự ảnh hưởng đến khả năng sinh trưởng của thực vật chuyển gen sau này. Bên cạnh đó, đến nay lĩnh vực công gen ở thực vật, phương pháp chuyển gen nhờ vi khuẩn *A. tumefaciens* vẫn được sử dụng phổ biến do chi phí thấp, thao tác chuyển gen khá đơn giản và có ưu điểm là đưa vào cây ít copy vì thế sẽ thuận lợi hơn khi đánh giá phân li ở những thế hệ sau (Char *et al.*, 2016). Vì vậy, dòng *A. tumefaciens* tái tổ hợp với gen ZmbZIP72 sẽ là nguồn nguyên liệu hữu ích để sử dụng cho các thí nghiệm nhằm chuyển gen vào thực vật.

KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, bằng kỹ thuật RT-PCR, đoạn gen mã hóa nhân tố phiên mã ZmbZIP72 đã

được phân lập thành công từ RNA tổng số tách ở lá ngô giai đoạn ba lá được xử lý hạn 6 h của giống ngô Q12 (Tẻ vàng chất dẻo). Gen ZmbZIP72 phân lập được có vùng CDS với kích thước 894 bp có hai điểm thay đổi so với trình tự tham chiếu: ở vị trí 486 A>C và vị trí 493 C>T. Vector biểu hiện pCAMBIA1301 mang đoạn gen ZmbZIP72 đã được thiết kế thành công, trong đó gen đích được điều khiển bởi promoter cảm ứng RD29A và được chuyển vào chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* làm nguyên liệu phục vụ chuyển gen thực vật.

Lời cảm ơn: Công trình được hoàn thành với kinh phí từ đề tài: “Phân lập thiết kế gen chịu hạn phục vụ công tác tạo giống ngô biến đổi gen” giai đoạn 2014-2018 do Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn quản lý.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Busk PK, Pages M (1998) Regulation of abscisic acid-induced transcription. *Plant Mol Biol* 37: 425-435.
- Choi H, Hong J, Ha J, Kang J, Kim SY (2000) ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. *J Biol Chem* 275: 1723-1730.
- Char SN, Neelakandan AK, Nahampun H, Frame B, Main M, Spalding MH, Yang B (2016) An Agrobacterium-delivered CRISPR/Cas9 system for high-frequency targeted mutagenesis in maize. *Plant Biotechnol J* 15(2): 257-268
- Finkelstein RR, Gampala SSL, Rock CD (2002) Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell Suppl* 14: S15-S45.
- Guilinan MJ, Marcotte WR JR, Quatrano RS (1990) A plant leucine zipper protein that recognizes an abscisic acid response element. *Science* 250: 267-271.
- Hu W, Yang H, Yan Y, Wei Y, Tie W, Ding Z, Zuo J, Peng M, Li K (2016) Genome-wide characterization and analysis of bZIP transcription factor gene family related to abiotic stress in cassava. *Scient Rep* 6: 22783 DOI: 10.1038/srep22783.
- Jakoby, M, Weisshaar, B, Droge-Laser, W (2002) bZIP transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci* 7: 106-111.
- Jia Z, Lian Y, Zhu Y, He J, Cao Z, Wang G (2009) Cloning and characterization of a putative transcription factor induced by abiotic stress in *Zea mays*. *Afr J Biotechnol* 8: 6764-6771.
- Jin Z, Xu W, Liu A (2014) Genomic surveys and expression analysis of bZIP gene family in castor bean (*Ricinus communis* L.). *Planta* 239(2): 299-312.

- Kim SY (2006) The role of ABF family bZIP class transcription factors in stress response. *Physiol Plant* 126: 519-527.
- Lu G, Gao C, Zhong X, Han B (2009) Identification of *OsbZIP72* as a positive regulator of ABA response and drought tolerance in rice. *Planta* 229: 605-615.
- Mundy J, Yamaguchi-Shinozaki K, Chua NH (1990) Nuclear proteins bind conserved elements in the abscisic acid-responsive promoter of a rice *rab* gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 1406-1410.
- Nakashima K, Ito Y, Yamaguchi-Shinozaki K (2009) Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in *Arabidopsis* and grasses. *Plant Physiol* 149: 88-95.
- Nijhawan A, Jain M, Tyagi AK, Khurana JP (2008) Genomic survey and gene expression analysis of the basic leucine zipper transcription factor family in rice. *Plant physiology* 146: 333-350.
- Nieva C, Busk PK, Domiguez-Puigjaner E, Lunbreras V, Testillano PS, Risueno MC, Pages M (2005) Isolation and functional characterization of two new bZIP maize regulators of ABA responsive gene *rab28*. *Plant Mol Biol* 58: 899-914.
- Sakuma Y, Maruyama K, Osakabe Y, Qin F, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. (2006). "Functional analysis of an arabidopsis transcription factor, DREB2A, involved in drought-responsive gene expression". *The Plant Cell*, 18: 1292-1309
- Sheng Y, Zhang DF, Fu J, Shi YS, Song YC, Wang TY, Li Y (2012) Cloning and characterization of a maize bZIP transcription factor, *ZmbZIP72*, confers drought and salt tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Planta* 235: 253-266.
- Uno Y, Furihata T, Abe H, Yoshida R, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2000) *Arabidopsis* basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 11632-11637.
- Wang Z, Cheng K, Wan L, Yan L, Jiang H, Liu S, Lei S, Liao B (2015) Genome-wide analysis of the basic leucine zipper (bZIP) transcription factor gene family in six legume genomes. *BMC Genomics* 16: 1053 DOI 10.1186/s12864-015-2258-x.
- Wasilewska A, Vlad F, Sirichandra C, Redko Y, Jammes F, Valon C, Frey NF, Leung J (2008) An update on abscisic acid signaling in plants and more. *Mol Plant* 1: 198-217.
- Wei K, Chen J, Wang Y, Chen Y, Chen S, Lin Y (2012) Genome-wide analysis of bZIP-encoding genes in maize. *DNA Res* 19: 463-476.
- Xiong L, Schumaker KS, Zhu JK (2002) Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell Suppl* 14: S165-S183.
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2006) Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annu Rev Plant Biol* 57: 781-803.
- Z G E, Zhang YP, Zhou JH, Wang L. (2014) Roles of the bZIP gene family in rice. *Genet Mol Res* 13 (2): 3025-3036.
- Zhang X, Wollenweber B, Jiang D, Liu F, Zhao J (2008) Water deficits and heat shock effects on photosynthesis of a transgenic *Arabidopsis thaliana* constitutively expressing *ABP9*, a bZIP transcription factor. *J Exp Bot* 59: 839-848.

CONSTRUCTION AN EXPRESSION VECTOR AND *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* STRAIN CARRYING *ZmbZIP72* GENE ISOLATED FROM MAIZE

Pham Thi Hang, Ha Hong Hanh, Nguyen Thuy Linh, Le Thi Thu Hien, Nong Van Hai, Huynh Thi Thu Hue

Institute of Genome Research, Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

In plants, members of bZIP transcription factors are involved in various biological processes such as organ and tissue differentiation or vascular development. Moreover, the basic leucine zipper (bZIP) is one of the largest transcription factor families which play an important role in environmental stress responses. However, few bZIP genes are related to abiotic stress responses. Some studies have found that transgenic plants overexpressing the bZIP genes enhanced tolerance to abiotic stresses. Several of stress-related genes in maize have been identified and characterized. A *ZmbZIP72* gene belonged to A group could be strongly induced by ABA and abiotic stresses. Some previous studies have shown that overexpression of the *ZmbZIP72* gene resulted in improved drought and salt tolerance of a transgenic *Arabidopsis*. In this work, the *ZmbZIP72* gene from drought-treated maize was isolated and sequenced with 894 bp in full-length of the coding region. Nucleotide comparison of the *ZmbZIP72* gene and a GenBank sequence (accession number HQ328839) revealed that two changes were found at positions 486 (A to C) and 493 (C to T), respectively. Changes in predicted amino acid sequence were at positions 102 (Lys>Asp) and 105 (Pro>Ser). The newly isolated

ZmbZIP72 gene was ligated with RD29A promoter and 35S terminator to create a RD29::*ZmbZIP72*::35S cassette in pRTL2 vector. Afterwards, this cassette was constructed into pCAMBIA1301 and the new recombinant pCAMBIA1301 vector carrying *ZmbZIP72* construct has transformed into *A. tumefaciens* strain EHA105 which is material for plant transformation.

Keywords: *Agrobacterium tumefaciens*, maize, transcription factor, vector construction, *ZmbZip72* gene